

# Isolasi dan Uji Biokimia Bakteri Selulolitik Asal Saluran Pencernaan Rayap Pekerja (*Macrotermes* spp.)

Gergonius Fallo<sup>a</sup> Yuni Sine<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Fakultas Ilmu Pendidikan, Universitas Timor, Kefamenanu, TTU – NTT, 85613, Indonesia, email: [gergofallo@yahoo.com](mailto:gergofallo@yahoo.com)

<sup>b</sup>Fakultas Sains dan Teknologi, Program Studi Biologi Universitas Timor, Kefamenanu, TTU- NTT, 85613, Indonesia

## Article Info

### Article history:

Received 27 Agustus 2015

Received in revised form 12Desember 2015

Accepted 11Januari 2016

### Keywords:

Bakteri

Saluran Pencernaan

*Macrotermes* spp.

## Abstrak

Di alam, rayap sangat berguna mengubah kayu mati dan bahan organik lainnya yang mengandung selulosa untuk dijadikan humus. Rayap mampu mendegradasi selulosa karena pada saluran pencernaannya terdapat mikroorganisme simbiosis seperti bakteri dan protozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri yang bersimbiosis dengan rayap, kemudian dilakukan karakterisasi morfologi, fisiologi dan biokimia. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif. Rayap yang digunakan dalam penelitian ini merupakan rayap pekerja (*Macrotermes* spp.) yang diambil dari tanah. Isolasi dilakukan melalui dua cara yaitu tusuk dan gerus. Isolasi tunggal yang diperoleh kemudian diinokulasikan pada media agar miring TSA untuk dilakukan uji fisiologis berupa uji indol, MR-VP, simmon sitrat, urease, fermentasi. Hasil isolasi diperoleh satu isolat dengan ciri koloni berwarna putih dengan bintik hitam di tengah, berbentuk sirkular dengan tepi perifer, tepi luar koloni undulate bergelombang dengan elevasi cembung. Hasil uji biokimia dan fisiologi isolat diketahui uji indol negatif, MR negatif, VP negatif, simmon sitrat negatif, urease negatif, fermentasi positif.

## 1. Pendahuluan

Fakta yang dapat dijumpai dalam kehidupan sehari-hari, rayap merupakan serangga hama yang merugikan secara ekonomi karena menimbulkan kerusakan pada bangunan, berbagai jenis kayu, serta tanaman pertanian. Rayap memegang peranan penting dalam degradasi tanaman. Hal ini disebabkan karena pada sel tanaman mengandung serat atau lignoselulosa termasuk selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Rayap mampu mendegradasi tanaman karena dalam saluran pencernaan terdapat mikroba simbiosis pencernaan serat. Mikroba di dalam saluran pencernaan rayap terdiri dari protozoa, bakteri, *spirochetes*, dan fungi (Ramin *et al.* 2008).

Keberadaan bakteri simbiotik dalam saluran pencernaan memungkinkan rayap untuk mencerna selulosa. Pada saluran pencernaan rayap *Mastotermes darwiniensis* dapat ditemukan bakteri *Promicromonospora citrea*, *Promicromonospora sukumoe* dan genus *Cellulosimicrobium* (Bakalidou *et al.* 2002). *Clostridium cellulovorans* bisa memproduksi enzim selulase kompleks (Murashima *et al.* 2002). Selain itu, saluran pencernaan rayap mengandung beberapa bakteri Gram-positif dari kelompok Actinomycetes ordo Actinomycetales yang meliputi genus *Cellulomonas*, *Microbacterium*, kelompok ordo Bacillales yang meliputi genus *Bacillus*, *Brevibacillus* dan *Paenibacillus*. Terdapat juga genus *Agrobacterium/Rhizobium*, *Brucella/Ochrobactrum*, *Pseudomonas* (Wenzel *et al.* 2002). Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis keberadaan bakteri dalam saluran cerna rayap serta diidentifikasi.

## 2. Metode

### 2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA IPB bulan Desember 2014. Rayap yang digunakan dalam penelitian ini merupakan rayap pekerja (*Macrotermes* spp.) yang diambil dari tanah.

### 2.2 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dari usus rayap dilakukan dengan metode penusukan pada bagian perut rayap dengan ose dan metode penggerusan. Pada metode penusukan, perut rayap ditusuk untuk mengeluarkan usus menggunakan ose. Kemudian menggunakan pinset untuk menarik usus keluar. Selanjutnya cairan yang ada diperoleh digores kuadran menggunakan ose pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB). Cairan diambil kemudian digores kuadran pada media EMB. Pada metode gerus, rayap 10 ekor dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 0.5 ml garam fisiologis kemudian ditumbuk sampai hancur menggunakan lup. Selanjutnya digores kuadran menggunakan ose pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB). Untuk perlakuan gerus digores kuadran pada 2 media sedangkan penusukan di satu media. Setelah itu diinkubasi selama 1 hari.

### 2.3 Uji Fisiologis

Uji fisiologis dilakukan untuk mengetahui kemampuan fisiologis bakteri selulolitik antara lain uji MR-VP, TSIA, Indol, simmon sitrat, urease dan fermentasi glukosa, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Uji Oksidase. Uji MR-VP (*Methyl Red Voges-Proskauer*) dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengoksidasi glukosa dengan menghasilkan asam sebagai produk akhir dan berkonsentrasi tinggi (Sunatmo 2007). Satu lup biakan bakteri diinokulasikan pada media cair MR-VP 2,5 mL (sebanyak 2 tabung reaksi) dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam inkubasi, tabung reaksi pertama ditambahkan 3-4 tetes Merah Metil. Uji positif ditandai dengan warna larutan yang berubah menjadi warna merah yang menandakan fermentasi asam campuran, sedangkan tabung reaksi kedua ditambahkan 10 tetes larutan A ( $\alpha$ -naphthol) dan ditambahkan 10 tetes larutan B (KOH). Selanjutnya tabung reaksi dikocok kuat-kuat selama 20-30 detik, dan uji positif ditandai dengan larutan berwarna merah muda yang menandai asam.

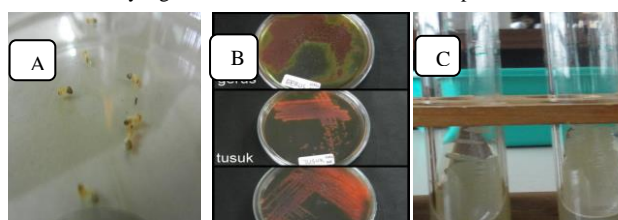
Uji TSIA dilakukan dengan menggoreskan biakan dengan ose steril pada media TSIA dengan cara menusuk ose sampai sepertiga dasar tabung. Kemudian diangkat dan digores secara zig zag pada permukaannya setelah itu

diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Uji indol dilakukan dengan menggunakan ose steril, diambil sebagian koloni dari NA miring lalu diinokulasikan pada media indol dengan cara diaduk, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam ditambahkan reagen kovac sebanyak 1-2 tetes. Uji Simmon sitrat dilakukan dengan menggunakan ose steril, diambil biakan dari NA miring, lalu ditanam pada media *Simmon's citrat* dengan cara digores secara zig zag pada permukaannya, setelah itu diinkubasi selama 24 jam. Uji urease dilakukan dengan cara menusuk ose sampai sepertiga dasar tabung, kemudian diinubasi selama 24 jam. Langkah pertama pada uji fermentasi glukosa adalah sebanyak satu lup inokulasi biakan bakteri diinokulasikan pada media PRGB (*Phenol Red Glucose Broth*) 85 mL yang telah diberi tabung Durham sampai tidak ada gelembung. Media PRGB stok 1 liter mengandung trypton 10 g, glukosa 5 g, NaCl 5 g, dan *Phenol Red* 0,018 g. Setelah diinkubasi selama 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna dan ada tidaknya gelembung. Warna merah menandakan asam, dan warna merah kuning menandakan basa. Ada tidaknya gelembung menandai CO<sub>2</sub> hasil fermentasi.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri asal saluran pencernaan rayap (gambar 1.A) diperoleh 1 (satu) isolat menggunakan media EMB (gambar 1.B). Secara morfologi koloni isolat berwarna putih dengan bintik hitam di tengah, berbentuk sirkular dengan tepi perifer, tepi luar koloni undulate bergelombang dengan elevasi cembung. Media EMB adalah media isolasi untuk membedakan bakteri *Enterobacteriaceae*. Media EMB Agar digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya bakteri koliform di dalam usus rayap. Koliform tampak pada media EMB dengan warna koloni hijau atau putih metalik. Hasil isolasi bakteri pada media EMB yang telah murni dan diinokulasikan pada media TSA disajikan



Gambar 1. (A) Rayap (*Macrotermes* spp.), (B). Penggoresan dengan metode gerus dan tusuk pada media EMB, (C). Isolat murni bakteri pada usus rayap *Macrotermes* spp.

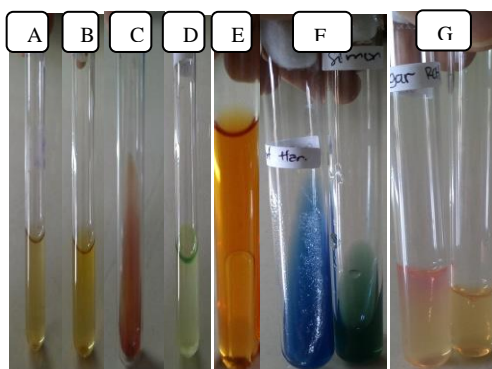
Keberadaan mikroba di dalam usus rayap merupakan suatu bentuk interaksi yang menguntungkan (simbiosis mutualisme). Rayap memberikan perlindungan berupa tempat yang anaerob dan makanan bagi mikroba. Di lain pihak mikroba menyumbang enzim selulase untuk membantu proses pencernaan serat kasar bagi rayap. Di dalam saluran pencernaan rayap terdapat mikroba selulolitik yang berperan dalam mendegradasi partikel-partikel kayu menjadi senyawa terlarut yang banyak mengandung selulosa (kurang lebih 40-45% bahan kering). Selain itu, Hyodo *et al.* (2000) melaporkan bahwa terdapat kontribusi cendawan dalam mendegradasi ligninselulosa pada pencernaan rayap. Berdasarkan tempat dan bahan yang didegradasi, maka mikroba selulolitik yang ada di dalam saluran pencernaan rayap, gajah, kerbau, dan sapi mempunyai karakteristik yang berbeda-beda, misalnya ada yang mempunyai aktivitas CMC-ase tinggi, tetapi aktivitas eksoglukanase maupun  $\beta$ -glukosidasenya rendah, demikian pula sebaliknya (Nakashima *et al.* 2002).

### 3.2 Uji Biokimia

bakteri selulolitik yang diperoleh menunjukkan hasil yang beragam. Tabel 1 menunjukkan hasil uji fisiologis yang meliputi uji katalase, MR-VP, dan fermentasi glukosa pada media PRGB. Uji katalase positif ditandai dengan adanya gelembung-gelembung yang terbentuk pada saat bakteri diinokulasikan di atas cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uji fermentasi glukosa positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning dan terbentuk gelembung pada tabung durham, sedangkan hasil uji MR-VP positif ditandai dengan MR berwarna merah dan VP berwarna merah muda.

Tabel 1 Hasil uji fisiologis bakteri selulolitik

No	Uji	Hasil	Keterangan
1	MR	Negatif	Warna merah (+) tidak terbentuk
2	VP	Negatif	Warna merah muda (+) tidak terbentuk
3	TSIA	Negatif	Warna kuning (+) tidak terbentuk
4	Produksi indol	Negatif	Lapisan merah ungu (+) tidak terbentuk
5	Fermentasi glukosa	Positif	Warna kuning tidak sempurna
6	Simmone Citrate	Negatif	Warna biru gelap (+) tidak terbentuk
7	Urease	Negatif	Warna merah muda (+) tidak terbentuk



Gambar 2 Hasil Uji fisiologis isolat bakteri selulolitik. (A) Uji MR (B) Uji VP (C) Uji TSIA (D) Uji produksi indol (E) Uji fermentasi glukosa (F) Uji Simmone citrate (G) Uji urease

Uji fisiologis dilakukan untuk mengetahui kemampuan fisiologi bakteri selulolitik yang diperoleh. Hasil uji MR-VP menunjukkan negatif karena warna akhir yang ditunjukkan adalah kuning kecokelatan bukan merah atau merah muda. Hal tersebut mengindikasikan bahwa bakteri selulolitik hasil isolasi tidak mampu mengoksidasi glukosa menjadi asam secara sempurna. Menurut Sunatmo (2007), uji MR-VP bertujuan mengetahui kemampuan suatu bakteri dalam mengoksidasi glukosa dengan menghasilkan asam sebagai produk akhir dan berkonsentrasi tinggi. Uji Voges Proskauer ditujukan untuk mengevaluasi kemampuan organisme menghasilkan substansi non asam atau produk akhir netral seperti asetilmetil karbonil dari asam organik sebagai hasil metabolisme glukosa. Uji berikutnya yakni TSIA yang bertujuan untuk membedakan berbagai genus Enterobacteriaceae yang kesemuanya adalah bakteri Gram negatif yang mampu memfermentasi glukosa dengan menghasilkan asam dan juga dapat membedakan Enterobacteriaceae dari *Bacillus* usus lain yang Gram negatif. Hasil uji menunjukkan bagian agar merah juga bagian bawah atau tidak ada perubahan pada bagian bawah (jingga-merah). Hal ini mengindikasikan fermentasi karbohidrat tidak berlangsung tetapi kaatabolisme pepton terjadi dalam lingkungan anaerobik atau aerobik menghasilkan reaksi alkalin akibat produksi amonia. Apabila degradasi proton berlangsung secara aerobik maka reaksi alkalin tampak pada bagian agar miring sedangkan pada pemanfaatan aerobik dan anaerobik dari pepton maka reaksi terlihat pada bagian agar miring dan bagian bawah agar.

Uji keempat ialah uji produksi indol yang ditujukan untuk mengetahui kemampuan mikroba mendegradasi asam amino triptofan. Hasil uji menunjukkan hasil yang negatif yang artinya isolat yang diperoleh tidak memiliki kemampuan menghidrolisis triptofan. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan medium, sedangkan reaksi negatif ditandai dengan terbentuknya cincin kuning. Uji indol digunakan untuk mengetahui adanya enzim triptofanase pada bakteri yang dapat menghidrolisis asam amino triptofan menjadi indol dan asam piruvat. Asam amino triptofan merupakan asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber energi. Adanya indol dapat dideteksi dengan menggunakan reagen Kovac's yang akan membentuk lapisan atau cincin merah pada permukaan medium. Warna tersebut terbentuk karena indol yang berada dalam medium diekstrak ke dalam lapisan reagent oleh komponen asam butanol dan membentuk kompleks dengan p-dimethylaminobenzaldehyde (Cappuccino dan Sherman 2005). Uji kelima ialah uji fermentasi glukosa. Selama proses inkubasi, karbohidrat yang

difermentasi akan menghasilkan asam yang menyebabkan indikator *brom cresol purple* (bcp) berubah dari warna ungu menjadi kuning dan dapat pula diikuti dengan pembentukan gas dalam tabung durham (reaksi positif), bila tidak terjadi perubahan warna medium maka reaksi negatif. Hasil praktikum yang ditunjukkan sedikit positif, dikarenakan warna yang ditunjukkan tidak kuning sempurna melainkan merah mendekati kekuningan dan gelembung-gelembung yang terbentuk pada tabung Durham sangat kecil. Hal tersebut mengindikasikan bahwa glukosa tidak dapat terfermentasi secara sempurna.

Uji Simmone citrate merupakan salah satu komponen utama dalam siklus Krebs yang merupakan hasil reaksi antara asetil koenzim A (CoA) dengan asam oksaloasetat (4C). Sitrat dibuat oleh enzim sitrase yang menghasilkan asam oksaloasetat dan asetat kemudian melalui proses enzimatis diubah menjadi asam piruvat dan karbon dioksida. Selama reaksi tersebut medium menjadi bersifat alkali (basa) karena karbondioksida yang berikatan dengan sodium (Na) dan air (H<sub>2</sub>O) membentuk sodium karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Adanya sodium karbonat inilah yang akan mengubah indikator *bromthymol blue* pada medium menyebabkan medium berubah warna dari hijau menjadi biru tua (biru prusia) (Cappuccino dan Sherman 2005). Hasil uji menunjukkan hasil yang negatif karena tidak terjadi perubahan warna media setelah inkubasi selama 24 jam. Uji ketujuh ialah uji urease. Reaksi positif ditandai dengan perubahan medium menjadi merah muda (sangat merah muda). Perubahan warna dapat terjadi saat enzim urease memutus ikatan karbon dan nitrogen untuk membentuk amoniak. Adanya amoniak menyebabkan suasana medium menjadi alkali/basa sehingga indikator *phenol red* akan berubah menjadi merah muda pada medium, hal ini mengindikasikan terjadinya reaksi positif atau dihasilkannya urease (Cappuccino dan Sherman 2005). Hasil uji menunjukkan hasil yang negatif karena pada media tidak terbentuk warna merah muda setelah inkubasi selama 24 jam.

Hasil uji fisiologis yang dilakukan tidak cukup untuk menduga jenis bakteri asal saluran pencernaan rayap. Perlu dilakukan pengamatan morfologi, atau analisa molekuler untuk mengetahui jenis bakterinya. Secara umum, bakteri asal saluran pencernaan merupakan mikroorganisme simbiosis beserta fungi dan protozoa. Menurut Husseneder *et. al.* (2005), bakteri asal saluran pencernaan terdiri dari spesies bakteri yang termasuk ke dalam kelompok Enterobacteriaceae, Bacteroidales dan Lactobacillales. Rayap yang memperoleh nutrisi dari kayu memiliki kaitan erat dengan mikroorganisme simbiosis yang hidup di saluran pencernaan rayap. Mikroorganisme simbiosis tersebut berupa protozoa, fungi, atau bakteri. Mikroorganisme simbiosis ini berperan dalam proses pencernaan selulosa dan hemiselulosa, asetogenesis, hidrogenesis, metanogenesis, reduksi sulfat, dan fiksasi nitrogen (Adams dan Boopathy 2005). Salah satu protozoa berflagel diketahui memiliki peran dalam memproduksi hydrogen molecular (H<sub>2</sub>) ke dalam saluran pencernaan rayap (Inoue *et. al.* 2007).

Terdapat mikroorganisme saluran pencernaan rayap yang memiliki kemampuan dalam memfiksasi nitrogen. Peran mikroorganisme ini adalah menyediakan ammonia bagi rayap karena makanan rayap merupakan jenis diet rendah nitrogen (Doolittle *et. al.* 2008). Terkait dengan metanogenesis, rayap merupakan salah satu penyumbang gas rumah kaca metan kurang dari 5% dari total emisi metan global (Velu *et. al.* 2011). Menurut Radek (1999), degradasi selulosa kayu diawali dengan enzim rayap dan dibantu oleh enzim cendawan. Hasil degradasi selanjutnya diproses oleh protozoa tertentu. Bakteri berperan dalam menjaga keseimbangan populasi dan metabolisme di dalam saluran pencernaan rayap. Selain itu, beberapa bakteri mampu mendegradasi selulosa. Dalam melakukan aktivitasnya, bakteri membutuhkan nitrogen dan fosfor dari lingkungan saluran pencernaan. Menurut Adams & Boopathy (2005), mikroba simbiosis menciptakan kondisi yang cocok untuk protozoa simbiosis melalui produksi nutrisi dan penjagaan kondisi keasaman dan anaerob di saluran pencernaan.

### 4. Simpulan

Satu isolat berhasil diisolasi dengan karakter morfologi koloni berwarna putih dengan bintik hitam di tengah, berbentuk sirkular dengan tepi perifer, tepi luar koloni undulate bergelombang dengan elevasi cembung. Hasil uji biokimia dan fisiologi isolat diketahui uji indol negatif, MR negatif, VP negatif, simmon sitrat negatif, urease negatif, fermentasi positif.

### Pustaka

- Adams L, Boopathy R. 2005. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. *Bioresource Technology*, vol 96, hal.1592–1598.
- Bakalidou A, Kampfer P, Berchtold M, Kuhnigk T, Wenzel M, Ko nig H. 2002. *Cellulosimicrobium variabile* sp. a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *J Syst Evol Microbiol*. No 52, hal. 1185–1192.
- Cappuccino, JC., Sherman, N. 2005. *Microbiology-A laboratory Manual*. 6<sup>th</sup> Ed., Pearson Education (Singapore), Indian branch, Dehli, India, pp: 280-285.
- Doolittle M, Raina A, Lax A, Boopathy R. 2008. Presence of nitrogen fixing *Klebsiella pneumoniae* in the gut of the Formosan subterranean termite

(*Coptotermes formosanus*). *Bioresource Technology* vol 99, hal. 3297–3300.

Husseneder C, Billy R. Wise And Dennis T. Higashiguchi. 2005. Microbial Diversity In The Termite Gut: A Complementary Approach Combining Culture And Culture-Independent Techniques. *Proceedings Of The Fifth International Conference On Urban Pests*.

Hyodo *et al.* 2000. Role of the mutualistic fungus in lignin degradation in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus* (Isoptera; Macrotermitinae). *Soil Biol & Biochem* vol 32, hal. 653-658.

Inoue J, Saita K, Kudo T, Ui S, Ohkuma M. 2007. Hydrogen Production By Termite Gut Protists: Characterization Of Iron Hydrogenases Of Parabasalian Symbionts Of The Termite *Coptotermes Formosanus*. *Eukaryotic Cell* vol 6 no 10, hal. 1925–1932.

Murashima KA, Kosugi, Doy RH. 2002. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol.* Vol 184, No 18, hal. 5088-5095.

Nakashima *et al.* 2002. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochem and Molecul Biol* vol 32, hal. 777-784.

Radek R. 1999. Flagellates, Bacteria, and Fungi Associated with Termites: Diversity and Function in Nutrition - A Review. *Ecotropica* vol 5, hal. 183-196.

Ramin AG, Shoorojeh Sj, Ashtiani HRA, Naderi MM, Behzadi MA, Tamadon A. 2008. Removal of metallic objects from animal feeds: development and studies on a new machine. *J Vetr.* Vol 3, no 2, hal. 1-6

Sunatmo TI. 2007. *Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium*. Jakarta: Ardy Agency.

Velu G, Ramasamy K, Kumar K, Nallapeta S, Mula RVR. 2011. Green house gas emissions from termite ecosystem. *African Journal of Environmental Science and Technology* Vol 5, No 2, hal. 56-64.

Wenzel MI, Schonig M, Berchtold P, Kampfer, Konig, 2002. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J. Applied Microbiol.* Vol 92, hal. 32-40.